昆虫神经毒素 BjαIT 的表达及杀虫活性

李洪波，夏玉先*

（重庆大学生物工程学院基因工程研究中心，重庆市杀虫真菌农药工程技术研究中心，
重庆市高校功能基因及调控技术重点实验室，重庆 400030）

摘要：根据毕赤酵母 *Pichia pastoris* 密码子偏爱性，不改变毒素蛋白质一级结构，设计合成了昆虫神经毒素 BjαIT 基因，并分别克隆至大肠杆菌 *Escherichia coli* 融合表达载体 pPET30-a(+)和毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9K。在 IPTG 的诱导下，神经毒素在大肠杆菌中融合表达，表达产物利用镍亲和层析柱纯化，纯化产物用于制备抗血清和活性测试。采用斑点杂交，筛选得到了较高水平分泌表达重组 BjαIT 的酵母转化子，摇瓶条件下，毒素表达量最大可达约 20 mg/L。大肠杆菌 BjαIT 表达产物对东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 和德国小蠊 *Blattela germanica* 没有活性，但酵母表达产物经注射东亚飞蝗和德国小蠊表现出杀虫活性。

关键词：昆虫神经毒素；BjαIT；大肠杆菌；毕赤酵母；融合表达；东亚飞蝗；德国小蠊；杀虫活性

中图分类号：Q965.8 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)11-1138-06

Expression and insecticidal activity of insect-specific neurotoxin BjαIT

LI Hong-Bo，XIA Yu-Xian*（Genetic Engineering Research Center，Bioengineering College of Chongqing University/Chongqing Engineering Research Center for Fungal Insecticides/Key Laboratory of Functional Gene and Regulation Technologies under Chongqing Municipal Education Commission，Chongqing 400030，China）

Abstract: According to the codon bias of *Pichia pastoris*，the insect-specific neurotoxin gene BjαIT was synthesized based on its amino acid sequence and was cloned to vectors of PET-30a(+) and pPIC9K respectively. The fusion protein of BjαIT expressed in *Escherichia coli* was induced with IPTG and was purified with Ni-NTA His Bind Column. The purified fusion protein was used to prepare antiserum and conduct bioactivity test. Dot blotting was used to screen the high-level expressed transformants of *P. pastoris*. The results showed that the highest expression of recombinant BjαIT in *P. pastoris* was about 20 mg/L in baffled flasks，and the BjαIT fusion protein expressed in *E. coli* was not toxic to locust *Locusta migratoria manilensis* and cockroach *Blattela germanica*，but that expressed in *P. pastoris* had insecticidal activity against locust and cockroach through injection.

Key words: Insect-specific neurotoxin；BjαIT；*Escherichia coli*；*Pichia pastoris*；fusion expression；*Locusta migratoria manilensis*；*Blattela germanica*；insecticidal activity

虫害是造成农业减产的主要原因之一。目前，控制虫害的主要方法是使用化学农药，化学农药的大量使用产生了许多问题，如昆虫的抗药性增强、农药残留量增多、环境污染、杀伤昆虫天敌、破坏生态平衡、造成害虫再猖獗等。传统生物杀虫剂虽然能克服以上不足，但也存在见效慢的缺点。因此，运用基因工程手段设计改造传统生物杀虫剂非常紧迫。蝎长链昆虫神经毒素对昆虫有高度选择性毒杀作用，其作用位点主要是昆虫钠离子通道，由 60～70 个氨基酸组成，有 2～4 对链内二硫键（Zlotkin *et al*.，1991；Possani *et al*.，1999；Rodríguez de la Vega and Possani，2005）；因其基因来源丰富、种类多、基因较小、注射虫体引起麻痹和死亡所需的剂量低，应用蝎昆虫神经毒素改造传统生物杀虫剂表现出了很大的潜力。目前，已成功将蝎昆虫神经毒素基因转入昆虫病毒（Vasconcelos *et al*.，2005；Rajendra *et al*.，2006）及虫生真菌中（Wang and St Leger，2007），增强了它们的杀虫效果，通过将毒素基因转入到植

基金项目：国家“863”计划项目(2006AA10A212)
作者简介：李洪波，男，湖南人，硕士，主要从事微生物基因工程研究，E-mail：lihongbo8007@163.com
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：yuxianxia@cqu.edu.cn
收稿日期 Received：2008-06-27；接受日期 Accepted：2008-09-30

物中，获得了抗虫植株（伍宁丰等，2000）。

蝎昆虫神经毒素 BjαIT 是从一种蝎类 *Buthotus judaicus* 毒液中分离的昆虫长链神经毒素，成熟毒素由 64 个氨基酸残基组成，有 4 对链内二硫键，作用位点是昆虫钠离子通道，该毒素对蝗虫和小蠊的半数瘫痪剂量（PD_{50}）约为 50 ng/g 体重，对小鼠没有毒性，说明 BjαIT 具有高效、专一的抗昆虫活性，是一种新型高效的昆虫神经毒素，具有控制农业害虫的重要潜在应用价值（Arnon *et al*.，2005）。德国小蠊 *Blattela germanica*（L.）对神经毒素敏感且能表现出典型的中毒症状；而蝗虫是我国主要农业害虫之一，但迄今未见重组 BjαIT 毒素对蝗虫作用的报道。因此，本文以东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*（Meyen）和德国小蠊为供试昆虫来检测表达产物的活性，为进一步利用该毒素控制害虫提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　质粒、菌株与 BjαIT 基因：表达菌株与载体：大肠杆菌 BL21（DE3）、大肠杆菌表达载体 pET30a（+）、毕赤酵母 KM71 菌株及分泌表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。毒素基因：BjαIT 基因根据成熟毒素的氨基酸序列和毕赤酵母密码子偏好性由上海 Sangon 公司合成并连接至载体 pPIC9K，重组载体命名为 pPIC9K/BjαIT。

1.1.2　酶和试剂：质粒小量的抽提试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司；镍亲和层析柱（Ni-NTA His Bind Column）购自 Qiagen 公司，AP 及 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国公司；各种工具酶为 Promega 公司产品；PCR 引物由 Invitrogen 公司合成；超滤管及 96 孔酶标板为 Millipore 公司产品；Bradford 溶液及 PVDF 膜为 Bio-Rad 公司产品；预染小分子量蛋白质标准购自 Geneview 公司，一般化学试剂为国产分析纯。

1.1.3　供试昆虫：东亚飞蝗 4 龄若虫（500 ± 30 mg）和德国小蠊 5 龄若虫（70 ± 10 mg）由本实验室饲养。

1.2　BjαIT 基因的合成和表达

1.2.1　BjαIT 在大肠杆菌中的表达、纯化及制备抗血清：质粒 pPIC9K/BjαIT 为模板，原核表达上游引物 PF 5′-ccggaattcggtagagacgctta-3′，下游引物 PR 5′-cgaagctttctgcaggctccaggga-3′，对 BjαIT 进行扩增、切胶回收、*Hin*dⅢ和 *Eco*RⅠ双酶切、连接至 pET-30（a+）质粒并转化大肠杆菌 JM109 菌株；试剂盒抽提经测序验证的重组质粒 pET-30（a+）/BjαIT，转化大肠杆菌 BL21（DE3）菌株。挑取转化子单菌落，接种至 20 mL 含 70 mg/L Kan LB 液体培养基的 50 mL 三角瓶中，37℃、250 rpm 培养过夜；取 1 mL 菌液接种至 200 mL 含 70 mg/L Kan LB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中，37℃、250 rpm 培养至 OD_{600} = 0.6 ~ 0.8，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，诱导 6 h，离心得菌体；采用 Ni-NTA His Bind Column 纯化目标产物，详细步骤参考精编分子生物学实验指南（林玲等，2007）；Bradford 法测定蛋白浓度，15% SDS-PAGE 银染检验纯度。纯化产物经截留分子量 3 kDa 的超滤管超滤脱盐、调整蛋白浓度后免疫 BALB/c 小鼠（购自第三军医大学），参照林玲等（2007）的方法制备抗血清并测定效价。

1.2.2　高水平表达酵母转化子的筛选：重组质粒 pPIC9K/BjαIT 采用 *Sal*Ⅰ线性化后，电转化毕赤酵母，转化子的筛选及 PCR（引物为通用引物 5′Factor 和 3′AOX）检测参照毕赤酵母表达试剂盒说明书（Invitrogen）。挑取经 PCR 验证的毕赤酵母转化子，划线接种至 YPD 平板，28℃，培养 3 d；挑取部分长势优良的单菌落，接种至含 10 mL 毕赤酵母生长培养基（BMGY）的 50 mL 离心管中，28℃，250 rpm，培养至 OD_{600} = 2.0 ~ 6.0，2 000 g，5 min，离心得菌体，用 2 mL 的诱导培养基（BMMY）重悬菌体，于 28℃，250 rpm，诱导培养；每 24 h 补加一次甲醇，至终浓度为 0.5%，诱导培养 5 d；4 000 g 离心 10 min，取上清；Dot blotting 检测各菌株表达水平的高低，详细步骤参照标准方法（Frederick *et al*.，2000）。

1.2.3　最佳收获期的确定：按 1.2.2 的方法，高水平表达转化子三角瓶诱导培养 20 mL，诱导 7 d，每天取样 1 mL，离心取上清，－20℃冻存。取－20℃冻存的 0 ~ 7 d 的诱导产物，4℃解冻，离心取上清 50 μL，按 1∶1 比例加入 2×碳酸盐包被缓冲液（pH 9.6），混合均匀并加至 96 孔酶标板中，4℃包被过夜；本文中自制的抗血清稀释 10 000 倍液为一抗，HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 为二抗，ELISA 分析，详细步骤参照标准（Frederick *et al*.，2000）。

1.2.4　BjαIT 在酵母中表达产物的验证及扩大培养：经 5 d 诱导的培养物离心、取上清，Bradford 法测定总蛋白含量，16% SDS-PAGE 分析，并利用 Quantity one（Bio-Rad）分析目标蛋白含量。Western blotting 检测目标产物的表达情况，自制抗血清为一抗，二抗为 AP 标记山羊抗小鼠 IgG，Western blotting 按照标准的方法（Frederick *et al*.，2000）进行。

三角瓶诱导培养 100 mL 酵母高水平表达转化子，诱导培养 5 d，离心培养液，取上清。所得上清转移至截留分子量为 3 kDa 的超滤管中，4 000 g，4℃，离心至近干；加入 10 mL PBS 溶液，4 000 g，4℃，离心至近干，重复此操作 3 次。空质粒转化子诱导后，上清液同样按上述步骤处理。

1.3 活性测定

1.3.1 大肠杆菌 BjαIT 的融合表达产物的活性分析：纯化的融合蛋白经 3 kDa 超滤管脱盐、PBS 调整蛋白浓度 500 μg/mL；按 1∶1 的质量比与粗麸皮拌匀、晾干，饲喂东亚飞蝗 4 龄若虫 20 头，饲喂 24 h 统计蝗虫的虫口死亡数；设粗麸皮饲喂东亚飞蝗 4 龄若虫 20 头作对照组；喂养并连续观察 7 d。将上述处理好的融合蛋白腹腔注射德国小蠊 5 龄若虫 20 头，每头 2 μL（1 μg 纯化蛋白），注射 2 μL PBS 的德国小蠊 5 龄若虫 20 头作为对照；注射后观察。

融合 BjαIT 对德国小蠊的触杀活性测定参照唐国文等（2007）的方法，不同之处为：上述 500 μg/mL 融合 BjαIT 滴加到滤纸上，作成滤纸药膜系列，每皿饲养德国小蠊 8 头，每 48 h 更换经上述相同处理的加有融合 BjαIT 的新滤纸药膜一次，饲养 7 d；设滴加 PBS 培养皿作对照，所有处理均设 3 个重复。注射东亚飞蝗的方法与注射德国小蠊基本相似，注射剂量为每头 10 μL（5 μg 纯化蛋白）；同时，腹腔注射 10 μL PBS 的东亚飞蝗 4 龄若虫 20 头为对照组，注射 2 h 后统计蝗虫虫口死亡数并观察蝗虫的取食行为，观察 24 h。

1.3.2 酵母 BjαIT 表达产物的活性分析：酵母表达产物经截留分子量为 3 kDa 的超滤管脱盐、浓缩，PBS 调总蛋白浓度至 500 μg/mL，腹腔注射德国小蠊，每头 2 μL，共注射 20 头；空质粒转化子诱导上清液，经相同处理，PBS 调整蛋白浓度至 500 μg/mL，腹腔注射德国小蠊，每头注射 2 μL，作为阴性对照；同时，PBS 注射 20 头德国小蠊，每头注射 2 μL 为空白对照。注射东亚飞蝗的方法与注射德国小蠊基本一致，每头 10 μL，共注射 20 头；前述空质粒转化子诱导上清液及 PBS 注射蝗虫各 20 头，每头 10 μL，注射后于 12 h 及 24 h 统计虫口存活数。酵母 BjαIT 表达产物触杀德国小蠊的活性测定方法除利用上述酵母表达产物代替融合 BjαIT 外，其他步骤完全一致；设滴加 PBS 培养皿作对照，所有处理均设 3 个重复。前述酵母表达产物，按质量比 1∶1 与粗麸皮拌匀、凉干，饲喂东亚飞蝗 4 龄若虫 20 头，每 24 h 统计虫口死亡数，观察 7 d；前述空质粒转化子诱导上清液，按前述方法与粗麸皮拌匀，饲喂东亚飞蝗 4 龄若虫 20 头，作为对照。

2 结果与分析

2.1 BjαIT 基因的合成

按照毕赤酵母密码子的偏好性（http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi? Species = Pichia + pastoris + [gbpln]）合成熟毒素基因，5′端和 3′端分别设计 *Eco*R Ⅰ 和 *Avr* Ⅱ 酶切位点，在 *Avr* Ⅱ 位点后设 TAA TGA 双终止密码子，合成后连接至 pPIC9K 载体。合成的 BjαIT 序列：5′-ccggaattc GGTAGAGACGCTTACATCGCTGACAACTTGAACTGCGC TTACACCTGCGGTTCCAACTCCTACTGCAACACTGAGT GCACCAAGAACGGTGCTGTCTCCGGATACTGCCAATGG TTGGGAAAGTACGGAAACGCCTGTTGGTGCATCAATTT GCCTGACAAGGTCCCTATCAGAATCCCTGGAGCCTGTA GA*TAATGA*cctaggggc-3′（斜体代表双终止密码子，小写字母代表酶切位点和保护碱基）。

2.2 BjαIT 在大肠杆菌中的表达、纯化及抗血清制备

随机挑取 11 个 BL21（DE3）转化子，PCR 验证其在 210 bp 左右出现特异扩增（图 1），BjαIT 基因全长为 192 bp，合成基因中包含酶切位点及保护碱基，该 210 bp 片段与预期相符。BjαIT 蛋白分子量约 7.5 kDa，融合片段分子约为 8 kDa，15 kDa 的诱导蛋白是 BjαIT 融合蛋白，SDS-PAGE 银染分析表明，利用镍亲和层析，得到融合蛋白，纯化蛋白质与预期分子量大小相符（图 2）。BALB/c 小鼠经 1 次初次免疫与 3 次加强免疫、断尾取血，ELISA 测定效价最高小鼠的抗血清滴度超过 1∶512 000。

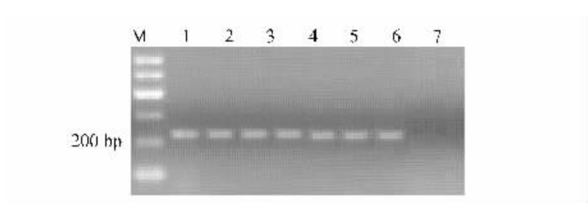


图 1 大肠杆菌转化子 PCR 检测.
Fig. 1 PCR results of *Escherichia coli* transormants
M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1-7: PCR 产物 PCR products; 8-9: 阴性对照 Negative control.

2.3 酵母转化子的检测及高表达菌株的筛选

挑取不同的酵母转化子，进行 PCR 分析，结果显示：pPIC9K/BjαIT 酵母转化子在约 400 bp 处存在特异条带，而未加模板及 KM71 出发菌株两组对照均未出现特异扩增（图 3），表明目标基因已成功插

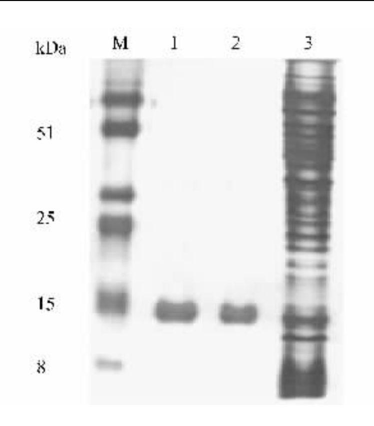


图 2　纯化产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 2　SDS-PAGE results of the purified protein

M：标准蛋白质 Standard proteins；1 – 2：纯化蛋白 Purified protein；3. 纯化前 Before purification.

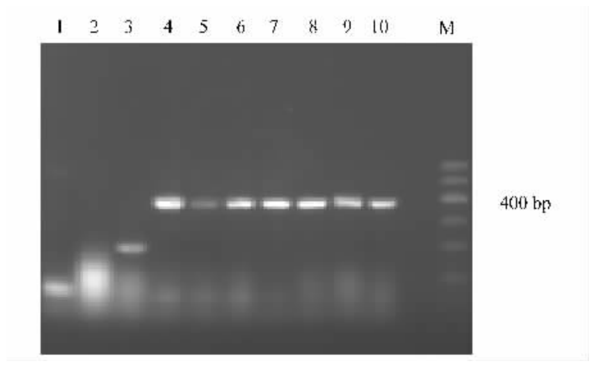


图 3　酵母转化子的 PCR 检测

Fig. 3　PCR results of *Pichia pastoris* transformants

1：双蒸水 ddH_2O；2：KM71 出发菌株 KM71 original strain；3：空质粒转化子 Transformant of pPIC9K；4 – 10：PCR 产物 PCR products；M：DNA 分子量标准 DNA marker.

入到毕赤酵母中。将验证后的酵母转化子菌体转入 50 mL 离心管进行诱导表达，诱导后的上清液经 dot blotting 分析，筛选到数株高表达菌株(图 4)。

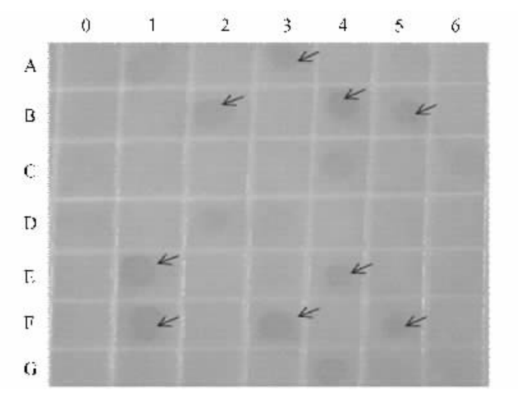


图 4　Dot blotting 筛选结果

Fig. 4　Results of screening by dot blotting

高表达转化子上清液如箭头所示 High-level expressed transformants were marked with black arrows.

2.4　最佳收获期的确定及产物验证

采用 ELISA 分析 BjαIT/F1 在诱导过程中毒素表达量的变化，结果显示，甲醇诱导的第 1 – 3 d 目标产物在上清中含量增加最快，在第 5 d 表达量达到最大值。因此，最佳收获期诱导后的第 5 d(图 5)；高表达菌株 BjαIT/F1 经扩大培养，甲醇诱导 5 d 后取上清液，经脱盐后 16% SDS-PAGE 银染分析，在约 7 kDa 处出现一特异蛋白带(图 6)；经蛋白质印迹验证，该 7 kDa 蛋白带是重组 BjαIT 蛋白，分子量与预期的毒素分子量大小相符(图 7)，表明该神经毒素实现了在酵母中的分泌表达。蛋白含量测定和 Quantity one 软件分析表明，在该培养和诱导条件下，诱导上清液的总蛋白含量最高可达 150 mg/L，而重组 BjαIT 约占总蛋白含量的 15%，即重组 BjαIT 在摇瓶条件下分泌表达量最高可达 20 mg/L。

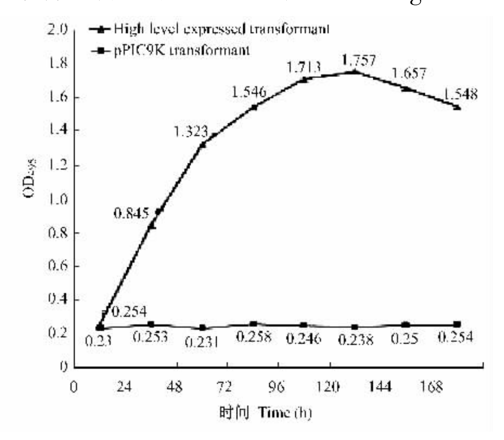


图 5　ELISA 确定收获期

Fig. 5　Determination of the harvest time by ELISA

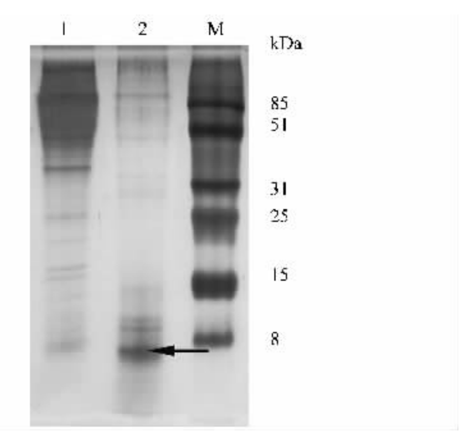


图 6　SDS-PAGE 分析

Fig. 6　SDS-PAGE analysis

1：空质粒转化子上清液 Supernatants of pPIC9K transformant；2：菌株 BjαIT/F1 上清液(箭头所示为重组 BjαIT)Supernatants of strain BjαIT/F1 (the black arrow stands for the recombinant BjαIT)；M：标准蛋白质 Standard proteins.

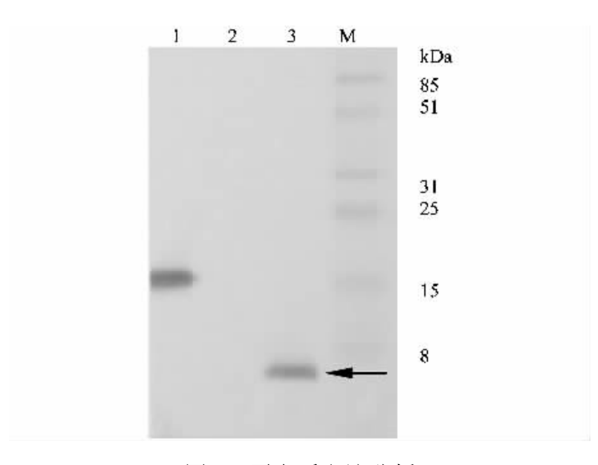


图7 蛋白质印迹分析

Fig. 7 Western blotting analysis of protein

1：大肠杆菌融合表达 BjαIT 纯化蛋白 Purified fusion protein of BjαIT expressed in *Escherichia coli*；2：空质粒转化子上清液 Supernatants of pPIC9K transformant；3：菌株 BjαIT/F1 上清液（箭头所示为重组 BjαIT）Supernatants of strain BjαIT/F1（The black arrow stands for the recombinant BjαIT）；M：标准蛋白质 Standard proteins.

2.5 杀虫活性测定

大肠杆菌 BjαIT 的表达产物注射和触杀德国小蠊都没有表现出毒性；转化子 BjαIT/F1 诱导产物注射德国小蠊后表现出翻正反射消失、胸足抖动明显且躯体呈现收缩症状并在 12 h 内全部死亡（表 1），而注射相同剂量的空质粒转化子诱导上清的德国小蠊在注射 24 h 内未表现出神经系统中毒症状。上述结果表明：原核表达产物对德国小蠊没有毒性，酵母表达产物经注射对德国小蠊具有杀虫活性。

表1 重组 BjαIT 在酵母中表达产物注射德国小蠊的结果

Table 1 Insecticidal activity of recombinant BjαIT with injection to cockroach *Blattela germanica*

注射物 Injection	注射后存活数 Survived cockroaches post injection		注射 24 h 后死亡率 Mortality（%） 24 h post injection
	12 h	24 h	
PBS	20	20	0
pPIC9K	20	20	0
BjαIT	0	0	100

大肠杆菌 BjαIT 的表达产物注射和饲喂东亚飞蝗没有表现出毒性；酵母分泌表达产物饲喂蝗虫没有检测到杀虫活性，但经注射表现出了杀虫活性：20 只供试蝗虫在注射酵母表达产物后活动能力迅速下降并停止取食，24 h 内全部死亡；注射空质粒转化子上清液的对照组蝗虫在注射后活动有所下降，但在注射 24 h 后，存活蝗虫的进食及活动能力恢复到注射前；注射 PBS 的 20 只供试蝗虫在注射后无虫口减少现象，且于注射后不久开始进食，进食与活动能力与注射前差别不明显（表 2）。上述结果表明：原核表达产物对供试昆虫蝗虫没有毒性，酵母表达产物经注射表现出杀蝗活性。

表2 重组 BjαIT 在酵母中表达产物注射蝗虫的结果

Table 2 Insecticidal activity of recombinant BjαIT with injection to locust *Locusta migratoria manilensis*

注射物 Injection	注射后存活数 Survived locusts post injection		注射 24 h 后死亡率 Mortality（%） 24 h post injection
	12 h	24 h	
PBS	20	20	0
pPIC9K	19	19	5
BjαIT	13	0	100

3 讨论

蝎毒液成分复杂，昆虫神经毒素在毒腺中的含量低，分离天然昆虫神经毒素并应用于毒素特性的研究是一项非常困难的工作，外源表达系统为我们更好地研究和应用该毒素奠定了基础。本研究以 PET30a（+）为表达载体，实现了 BjαIT 在大肠杆菌中的融合表达；生物活性测定表明，该表达系统表达的 BjαIT 不具生物活性。其原因主要在于：该蝎毒素含有 4 对二硫键，二硫键的正确形成对功能极其重要，而该大肠杆菌表达系统的表达产物二硫键不能正确配对（Trung *et al*.，2006），因而不能形式正确的高级结构；此外，该表达系统表达的产物为不可溶的包涵体，包涵体经溶解和复性才能恢复活性（Trung *et al*.，2006）；最后，由于在毒素的 N-端融合了长达几十个氨基酸残基的多肽，融合区段可能影响其空间结构的正确形成，从而不能形成正确的空间结构，影响其生物活性。

毕赤酵母是一种高效的外源蛋白表达系统，分泌型表达载体 pPIC9K 自身携带 α-交配因子信号肽序列，能分泌表达外源基因，表达产物的二硫键通常能正确配对、高级结构正确形成（Martin-Eauclaire *et al*.，1994）。因此，该系统被用于蝎毒素的活性分泌表达。本研究利用毕赤酵母表达系统，按毕赤酵母的密码子偏好性合成毒素基因，在甲醇诱导下，重组 BjαIT 在该表达系统中分泌表达，摇瓶条件下，最高表达量约为 20 mg/L。在活性测定中，重组 BjαIT 饲喂蝗虫没有表现毒杀作用，而注射对蝗虫具有杀虫活性。本研究曾选择了不同虫龄和体重的蝗虫，经饲喂都没有表现出杀虫活性，说明虫体大小不是该毒素没有饲喂活性的主要原因，可能是不同的神经毒素对不同的供试昆虫的毒性强弱不一样；另外，毒素在昆虫肠道中的稳定性的强弱也可能是该毒素

没有饲喂活性的另一原因。昆虫神经毒素在饲喂时是否表现出活性主要有以下两种观点：吉永华和赵菁(1996)认为，虫体对毒素的敏感性与虫体的大小呈对应关系，且不同的神经毒素对不同的供试昆虫的毒性强弱也不一样；Bishop 和 McCutchen 等(1991)认为毒素在昆虫肠道中的稳定性决定其经饲喂毒性的强弱。本文用毕赤酵母表达的 BjαIT 具有体内注射活性，其二硫键应正确形成，但不具有体外活饲喂活性，说明二硫键正确形成并不是影响体外活性的唯一因素，究竟还有其他什么影响还待进一步研究。

王二文等(2005)曾利用毕赤酵母表达系统对昆虫神经毒素 AaIT 进行表达，但 AaIT 基因是按大肠杆菌的密码子偏好性来设计合成的，同时转化酵母后获得的转化子相当有限，因此筛选到信号肽完全切除的分泌表达重组 AaIT 的毕赤酵母转化子的表达水平很低，AaIT 表达量约为 1 mg/L。本研究按照毕赤酵母的密码子偏好性来设计合成 BjαIT 基因，利用大肠杆菌表达的融合 BjαIT 为抗原制备的抗血清，采用 dot blotting 筛选到的高水平表达酵母转化子在摇瓶条件下信号肽完全切除的 BjαIT 的表达量可达约 20 mg/L，是王二文等(2005)表达的昆虫神经毒素 AaIT 的约 20 倍；ELISA 测定最佳收获期较传统的总蛋白分析更为准确，本文利用 ELISA 测定表明酵母在诱导约 5 d 时为最佳收获期。本实验室将以本研究结果为基础，纯化毕赤酵母中表达的 BjαIT，详细分析该毒素对蝗虫、玉米螟、稻纵卷叶螟等重要农业害虫的杀虫活性，为更广泛地应用该毒素提供依据；同时，BjαIT 具有体内注射活性，而绿僵菌可在蝗虫体内寄生，本研究组将利用王成树等(2007)的表达系统将 BjαIT 基因转化绿僵菌，探索转 BjαIT 基因绿僵菌的杀蝗活性。

参 考 文 献 (References)

Arnon T, Potikha T, Sher D, Elazar M, Mao W, Tal T, Bosmans F, Tytgat J, Ben-Arie N, Zlotkin E, 2005. BjαIT: a novel scorpion α-toxin selective for insects-unique pharmacological tool. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 187 - 195.

Frederick FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 2000. Short Protocols in Molecular Biology. 4th ed. John Wiley and Sons, Inc., USA.

Ji YH, Zhao J, 1996. Advances in insect poison of *Buthus martensii*. *Life Sciences*, 8: 37 - 39. [吉永华，赵菁，1996. 蝎抗昆虫毒素基因病毒距生物杀虫剂"任重而道远". 生命科学，8: 37 - 39]

Lin L, Yang XM, Lü JH, Han X, 2007. Prokaryotic expression, purification of Nono and preparation of its polyclonal antibody. *J. Med. Mol. Biol.*, (5): 375 - 379. [林玲，杨晓敏，吕京澴，韩晓，2007. Nono 蛋白的原核表达、纯化和多克隆抗体的制备. 医学分子生物学杂志，(5): 375 - 379]

Martin-Eauclaire MF, Søgaard M, Ramos C, Cestèle S, Bougis PE, Svensson B, 1994. Production of active, insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 223(2): 637 - 645.

McCutchen BF, Choudary PV, Crenshaw R Maddox D, Kamita SG, Palekar N, Volrath S, Fowler E, Hammock BD Maeda S, 1991. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: Potential for pest control. *Nature Biotechnol.*, 9: 848 - 852.

Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J, 1999. Scorpion toxins specific for Na^+-channels. *European Journal of Biochemistry*, 264: 287 - 300.

Rajendra W, Hackett KJ, Buckley E, Hammock BD, 2006. Functional expression of lepidopteran-selective neurotoxin in baculovirus: Potential for effective pest management. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1 760: 161 - 162.

Rodríguez de la Vega RC, Possani LD, 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na^+ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, 46: 831 - 844.

Tang GW, Yang CJ, Xue D, Xie LD, Chen HL, 2007. Extract from *Trigonella foenum-graecum* L. by the optimized SFE-CO2 extraction method and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* Fabricius. *Acta Entomologica Sinica*, 50: 355 - 360. [唐国文，杨长举，薛东，谢令德，陈慧玲，2007. 胡芦巴超临界 CO2 萃取物的萃取条件优化及其对谷蠹的触杀活性. 昆虫学报，50: 355 - 360]

Trung NP, Fitches E, Gatehouse JA, 2006. A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotechnol.*, 14: 18 - 29.

Vasconcelos SD, Hails RS, Speight MR, Cory JS, 2005. Differential crop damage by healthy and nucleopolyhedrovirus-infected *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: A field examination. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(2): 177 - 179.

Wang C, St Leger RJ, 2007. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nature Biotechnol.*, 25: 1 455 - 1 456.

Wang EW, Xu JP, Lu W, Wang J, Cao X, Meng XL, 2005. Expression and functional analysis of a recombinant scorpion neurototoxin AaIT. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 51: 727 - 732. [王二文，徐进平，鲁伟，王健，曹旭，孟小林，2005. 蝎神经毒素 AaIT 的表达及功能分析. 武汉大学学报(理学版)，51: 727 - 732]

Wu NF, Sun Q, Yao B, Fan YL, Rao HY, Huang MR, Wang MX, 2000. Insect-resistant transgenic poplar expressing AaIT gene. *Chinese Journal of Biotechnology*, 16(2): 129 - 133. [伍宁丰，孙芹，姚斌，范云六，饶红宇，黄敏仁，王明庥，2000. 抗虫的转 AaIT 基因杨树的获得. 生物工程学报，16(2): 129 - 133]

Zlotkin E, Eitan M, Bindokas VP, Adams ME, Moyer M, Burkhart W, Fowler E, 1991. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry*, 30: 4 814 - 4 821.

(责任编辑：赵利辉)